

Efeito da presença de um coespecífico no alojamento de ovelhas em novo ambiente, após estresse agudo causado pelo transporte*

Effect of the Presence of a Conspecific in the Housing of Sheep in the New Environment, Following Acute Stress Caused by Transportation

Fabiola Schons Meyer¹, Andréa Gonçalves Velasque², Marcelo de Souza Muccillo³ & André Silva Caríssimi⁴

ABSTRACT

Background: Sheep are social and gregarious animals. They feel at ease when free and clustered rather than isolated. In some situations, as in experimental procedures, they need to be separated from the flock and kept without social company. Both instances, separation from the flock and isolation are considered stressful and may impact their well being. As stress can affect the results of the study, special care should be taken when conducting biomedical or veterinary research. The aim of this study was to compare the concentration of cortisol and behavior of ewes housed at a research institution in the presence of a familiar conspecific, an unfamiliar conspecific or in the absence of conspecifics.

Materials, Methods & Results: Experimental procedures were approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil. Eighteen Corriedale ewes were divided into three groups. Group I ($n = 6$): the experimental sheep was housed with a familiar conspecific, an adult Texel sheep, kept in the same experimental flock of sheep throughout the study. Group II ($n = 6$): the experimental sheep was housed with a conspecific stranger, also an adult Texel sheep, but from a different flock. Group III ($n = 6$): the experimental ewe was kept in social isolation, without contact with conspecifics. Each ewe was transported from the source property to the location of the experiment, always at the same time, where remained under observation for six hours. A total of five blood samples for cortisol was collected: a baseline (before transportation), upon arrival at the experiment site and two, four and six hours after arrival. Animal behavior was recorded during the six-hour stay at the experimental site with a miniature camera. We assessed time of interaction with conspecifics, time spent on having food and water, rest, the number of bleating and number of steps. There were not statistically significant differences in measurements of cortisol between groups using repeated measures ANOVA. Statistical difference ($P < 0.05$) was observed on arrival (time 0 h), after transport in all groups, with a mean increase in plasma cortisol concentration of 259% (minimum=26% and maximum=1032%, standard deviation=261%). This study assessed the time two hours from the peak concentration of cortisol (time 0 h), by percentage, to minimize the differences among animals. Group I showed a decline of 54.08% (standard deviation 18.53); Group II, 43.52% (standard deviation 8.81); and Group III, 30.19% (standard deviation 14.30). Group I was statistically different from Group III ($P < 0.05$). Behavioral analysis showed no statistical difference in the parameters.

Discussion: The presence of a conspecific was found to be important in reducing the stress in the early hours in the new environment, observed by a decline in cortisol concentration. The decline was greater when the conspecific was known. Due to variability between animals, behavioral differences between groups were not shown. The separation of sheep and transport caused a significant increase in levels of cortisol, which corroborates literature describing these two procedures as stressors. Thus, we highlight the importance of achieving acclimatization for animals undergoing transport and accommodation in a new environment.

Keywords: sheep, cortisol, behavior, welfare, ethogram.

Descritores: ovino, cortisol, comportamento, bem estar, etograma.

INTRODUÇÃO

Os ovinos são animais gregários [3,9,14] e respondem ao isolamento com uma série de alterações comportamentais, endócrinas e fisiológicas [2,4,5,7,13,16,17,19]. Em determinadas situações, tais como na quarentena, tratamento em hospitais veterinários ou em baias individuais para procedimentos experimentais, os animais acabam sendo isolados do grupo e, portanto, é mais provável que tenham um comprometimento do bem-estar por falta de companhia social [14].

O estresse agudo do transporte pode alterar importantes medidas psicofisiológicas, podendo afetar os resultados da pesquisa, se esta for realizada antes que essas medidas se normalizem [12,15]. Os animais quando transportados devem passar por um período de adaptação fisiológica, psicológica e nutricional antes do início do experimento [11,15].

Outras práticas de manejo estão associadas ao estresse, como o alojamento com animais desconhecidos, a exposição a ambientes desconhecidos, desidratação, estresse térmico, privação de alimento, os riscos de danos físicos [8], bem como os possíveis estressores inerentes ao próprio procedimento experimental (por exemplo, dor, medo, imprevisibilidade, etc.).

O presente estudo teve por finalidade mensurar e comparar os níveis de cortisol plasmático e o comportamento de ovelhas alojadas em uma instituição de pesquisa, em diferentes condições de convívio social: na presença de um coespecífico familiar, de um coespecífico desconhecido ou na ausência de coespecíficos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi conduzido na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA/HCPA), localizada no hemisfério sul (30°05' S, 51°10' W), durante os meses de novembro e dezembro.

Dezoito ovelhas adultas, com idade entre um e dois anos, não prenhes e não lactantes, da raça Corriedale, foram aleatoriamente distribuídas em 3 grupos experimentais. No grupo I ($n = 6$), a ovelha experimental foi alojada com um coespecífico familiar, que era uma ovelha adulta da raça Texel, mantida no mesmo rebanho das ovelhas experimentais durante todo estudo. Essa ovelha foi escolhida por ser, segundo o produtor rural, a líder do rebanho. No grupo II ($n = 6$), a ovelha experimental foi

alojada com um coespecífico desconhecido, que também era uma ovelha adulta da raça Texel, porém esta era proveniente de um rebanho diferente e distante daquele citado acima. No grupo III ($n = 6$), a ovelha experimental foi mantida em isolamento social, sem contato com coespecíficos.

A rotina experimental foi igual para todos os grupos. Cada ovelha foi separada do rebanho e transportada sozinha até o local do experimento, distante 50 km (40 min de viagem), com exceção de 3 animais do grupo I, que foram transportados junto com a ovelha considerada coespecífico conhecido. Dessa forma, a logística foi facilitada e o fator companhia no transporte, que poderia reduzir o estresse, foi dividido. O transporte foi sempre realizado no mesmo horário (8:30 h). Na UEA/HCPA a ovelha foi mantida durante 24 h em uma baia medindo 150 cm x 110 cm, em sala climatizada ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz controlado (7:00 h-19:00 h) e livre acesso à água, ração fornecida pelo produtor rural e feno de alfafa.

A análise da concentração de cortisol no soro foi realizada no Serviço de Patologia Clínica, Unidade de Bioquímica-HCPA. As dosagens foram analisadas por eletroquimioluminescência, de uso da rotina do laboratório, e a sensibilidade para amostras de soro ovino foi previamente testada. As amostras foram obtidas em cinco momentos. A primeira coleta, chamada Basal, foi realizada ainda no local de origem das ovelhas, através de punção da veia jugular. A segunda coleta, chamada Tempo 0 h, foi realizada na chegada da ovelha ao local do experimento. Nesse momento, foi introduzido um cateter 20G na veia cefálica, para facilitar as coletas posteriores e minimizar o estresse do animal. As demais coletas foram duas, quatro e seis horas após o alojamento da ovelha. Todas as amostras eram centrifugadas por 10 minutos (2.500 x g) e o soro era separado e mantido em refrigeração até a análise.

O comportamento dos animais foi registrado durante as primeiras seis horas de permanência no local do experimento, através de micro câmera colorida com áudio. As imagens foram gravadas em computador para posterior registro do etograma, que consiste de uma planilha contendo o repertório de comportamentos típicos e atípicos da espécie. Todos os vídeos foram analisados pelo mesmo observador, que desconhecia a qual grupo pertencia a ovelha, pois as imagens mostravam somente a baia da ovelha experimental. Foi descontado um minuto logo após a colocação da ovelha na baia e após as intervenções para a coleta de

sangue.

Os seguintes comportamentos foram observados: Tempo de interação com os coespecíficos: foi considerado o tempo que o animal passava olhando em direção à baía da frente. Esse é o comportamento mais importante do estudo, pois reflete o quanto o coespecífico chama a atenção do animal. No caso do grupo III, foi registrado da mesma forma, servindo como parâmetro de comparação, para mostrar o quanto o animal olha ao acaso naquela direção. Tempo gasto ingerindo água e alimento: foi considerado o tempo que o animal estava próximo ao alimento/água, ingerindo ou investigando. Tempo de descanso: foi considerado quando o animal estava deitado. Número de balidos: foram contados os balidos da ovelha experimental, observando o movimento da boca se houvessem balidos da outra ovelha, nos grupos I e II. Número de passos: foi estabelecido um passo quando a ovelha movimentasse o membro anterior que não estava com o cateter intravenoso.

A análise descritiva foi apresentada através de média e desvio-padrão. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade das medidas de cortisol. A análise de variâncias (ANOVA) para medidas repetidas foi utilizada para comparar os valores de cortisol ao longo de todo o processo entre os diferentes grupos. Foram considerados significantes os valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Os valores médios e desvio do cortisol plasmático

estão apresentados na Tabela 1. Os resultados referem-se aos cinco tempos de coleta: no local de origem (basal), na chegada ao local do experimento (0 h) e nas horas subsequentes (2 h, 4 h e 6 h). Houve diferença estatística significativa nos valores médios do cortisol plasmático do tempo 0 h para os demais tempos, em todos os grupos, com um aumento médio de 259% (mínimo=26% e máximo=1032%, desvio padrão=261%). Não se observou diferença estatística significativa entre os grupos em nenhum tempo avaliado (ANOVA).

Foi realizada a avaliação do declínio da concentração de cortisol nas duas primeiras horas após a chegada à UEA, através da porcentagem do tempo 2 h em relação ao tempo 0 h (considerado 100%). Dessa forma as diferenças entre os animais são amenizadas, reduzindo o desvio padrão (Tabela 2). Foi evidenciada significância estatística ($P < 0,05$) entre os grupos I e III.

Os valores dos parâmetros comportamentais, avaliados a partir das filmagens realizadas nas primeiras seis horas de permanência na UEA, estão apresentados na Tabela 3. O tempo real de observação foi em média 5 h 51 min 42 s, com um desvio padrão de 7 min 36 s, pois os tempos de intervenção para a coleta de sangue variaram entre os animais. Por isso, os dados de interação com a baía da frente e do tempo de descanso são apresentados em porcentagem. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos parâmetros comportamentais avaliados.

Também foi realizado um teste de correlação linear de Pearson, entre a concentração de cortisol no

Tabela 1. Média e desvio padrão da concentração plasmática de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) dos grupos I (ovelha mantida com coespecífico familiar, $n=6$), II (ovelha mantida com coespecífico desconhecido, $n=6$) e III (ovelha mantida sozinha, $n=6$), alojados na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil, durante o mês de novembro de 2009.

Grupo	Basal	0 h	2 h	4 h	6 h
I	2,35 \pm 1,47 ^a	4,92 \pm 2,73 ^b	1,53 \pm 1,45 ^a	1,21 \pm 0,57 ^a	1,75 \pm 0,94 ^a
II	1,19 \pm 0,42 ^a	5,20 \pm 1,60 ^b	2,19 \pm 0,54 ^a	1,40 \pm 0,62 ^a	1,08 \pm 0,49 ^a
III	1,94 \pm 0,73 ^a	5,19 \pm 1,64 ^b	3,05 \pm 2,14 ^a	2,45 \pm 1,91 ^a	1,94 \pm 1,42 ^a

Médias nas linhas, seguidas de letras diferentes (*a,b*), diferem significativamente entre si, para o teste de Tukey $P < 0,05$. As coletas foram realizadas antes do transporte (Basal), imediatamente após o transporte (0 h) e duas, quatro e seis horas após o transporte (2 h, 4 h e 6 h, respectivamente).

Tabela 2. Média e desvio padrão da porcentagem (%) da concentração plasmática de cortisol duas horas após o transporte (2 h), dos grupos I (ovelha mantida com coespecífico familiar, $n=6$), II (ovelha mantida com coespecífico desconhecido, $n=6$) e III (ovelha mantida sozinha).

Grupo	2 h (%)
I	54,08±18,53 ^a
II	43,52±8,81
III	30,19±14,30 ^b

Médias nas linhas, seguidas de letras diferentes (*a,b*), diferem significativamente entre si, para o teste de Tukey $P < 0,05$. Para avaliar o declínio da concentração de cortisol de cada animal, o valor do tempo 2 h foi comparado ao valor imediatamente após o transporte (considerado 100%).

Tabela 3. Média e desvio padrão dos parâmetros comportamentais* avaliados nos grupos I (ovelha mantida com coespecífico familiar, $n=6$), II (ovelha mantida com coespecífico desconhecido, $n=6$) e III (ovelha mantida sozinha), durante as seis horas de observação na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil (Novembro de 2009). Os parâmetros dependentes do tempo estão expressos em porcentagem, pois o tempo total de observação variou entre os animais, em virtude do tempo gasto na coleta de sangue.

Grupo	% de tempo de interação com a baía da frente	% de tempo comendo	% de tempo de descanso	Nº de balidos	Nº de passos
I	37,86±15,68	8,46±10,95	9,70±16,89	13,33±20,69	200,67±68,64
II	24,02±15,34	15,88±12,24	4,23±8,04	4,33±6,59	291,40±114,82
III	27,40±12,19	19,65±16,88	3,98±6,25	27,50±53,88	225,67±157,0

*Tempo de interação com a baía da frente: foi considerado o tempo que o animal passava olhando em direção à baía da frente, para interação com os coespecíficos (Grupos I e II) ou por acaso (Grupo III); Tempo gasto ingerindo água e alimento: foi considerado o tempo que o animal estava próximo ao alimento/água, ingerindo ou investigando; Tempo de descanso: foi considerado quando o animal estava deitado; Número de balidos: foram contados os balidos da ovelha experimental, observando o movimento da boca se houvessem balidos da outra ovelha, nos grupos I e II; Número de passos: foi estabelecido um passo quando a ovelha movimentasse o membro anterior que não estava com o cateter intravenoso.

tempo 0 h (pico) e o tempo que o animal passou deitado. Essa correlação é negativa e estatisticamente significativa ($P < 0,05$; $r = - 0,449$), ou seja, quanto maior a concentração de cortisol após o transporte, menor o tempo de descanso do animal.

DISCUSSÃO

A separação do rebanho e o transporte causaram um aumento estatisticamente significativo da concentração plasmática de cortisol. Essa é uma resposta típica ao isolamento social em ovinos e corrobora com diversos estudos que mediram cortisol logo após o isolamento de ovelhas [1,2,4-7,13,16,17]. O aumento transitório do cortisol indica que a ovelha está apresentando uma resposta homeostática normal [8]. Moberg [10] sugere que o bem-estar do animal somente fica comprometido quando essas mudanças causam alterações no

seu funcionamento biológico, levando a um estado pré-patológico.

Transcorridas duas horas de permanência no novo ambiente pode-se observar que a concentração plasmática do cortisol diminuiu mais no grupo I, sendo este estatisticamente diferente do grupo III. Isso demonstra que a companhia de uma ovelha é importante na redução do estresse causado pela separação do rebanho. Já foi demonstrado que a companhia de um coespecífico é suficiente para neutralizar o efeito estressante do isolamento social [4]. No presente estudo, observa-se que o benefício é maior se o coespecífico é do mesmo rebanho. Segundo Nowak *et al.* [14], embora o contato social seja extremamente importante para as ovelhas, a presença de outra ovelha também pode atuar como uma fonte de estresse.

Observa-se que nos demais tempos a con-

centração de cortisol não foi diferente entre os grupos. Uma característica importante de qualquer sistema homeostático é o feedback dos hormônios que regulam a sua própria produção, assim, a resposta normal de cortisol é constituída por um aumento na sua produção, seguido por um declínio [8]. Essa diminuição da liberação de cortisol tem sido interpretada como uma redução na percepção da ameaça ou como habituação, considerando-se o animal menos estressado e com melhor bem-estar [18]. Por isso, a aclimatação do animal após o transporte e a exposição a um novo ambiente é fundamental antes de iniciar algum experimento, evitando ou minimizando a influência do estresse nos resultados [11,12]. Geralmente, mediadores primários do estresse, como catecolaminas e glicocorticóides, retornam ao normal em 24 horas após o transporte, enquanto repostas secundárias (sistema imune, por exemplo) podem demorar mais tempo [15].

Não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados. Os efeitos psicológicos do isolamento são observados nas ovelhas através do maior número de vocalizações e do comportamento de bater um membro no chão, além do menor tempo de descanso, de sono, de alimentação e ruminação [5]. Carbajal e Orihuela [4] também observaram maior número de passos e de vocalizações nas ovelhas isoladas. Observou-se que os animais do grupo III apresentaram maior número de balidos em relação aos outros grupos, no entanto sem significância estatística. Com relação ao aumento na atividade motora, representada através do número de passos, observou-se que as ovelhas do grupo II apresentaram mais atividade, ainda que

sem significância estatística, o que demonstra que um coespecífico desconhecido pode ser estressante [14]. Outro dado que corrobora é a menor interação com o coespecífico apresentada pelo grupo II, que foi inferior à do grupo III, considerada uma interação ao acaso com a baía da frente (sem coespecífico).

Apesar de não haver diferença significativa nos parâmetros de atividade (número de passos e no tempo de descanso), observa-se uma correlação negativa entre a concentração de cortisol no momento 0 h e o tempo de descanso. Esse dado contribui para validar a importância da aclimatação, mostrando como animais mais estressados descansam menos após o transporte e a exposição a um novo ambiente.

CONCLUSÃO

A companhia de um coespecífico mostrou-se importante na redução do estresse nas primeiras horas no novo ambiente, observada através do declínio da concentração de cortisol. O declínio foi maior quando o coespecífico era conhecido. Devido à variabilidade entre os animais, não foi possível evidenciar diferenças comportamentais entre os grupos. A separação do rebanho e o transporte causaram um aumento significativo da concentração de cortisol, corroborando com a literatura, que relata esses dois procedimentos como estressores. Assim, ressaltamos a importância da realização de aclimatação para animais submetidos a transporte e alojamento em um novo ambiente.

Comitê de Ética e Bioética. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, sob o número 09-071.

REFERÊNCIAS

- 1 Baldock N.M. & Sibly R.M. 1990.** Effects of handling and transportation on the heart rate and behaviour of sheep. *Applied Animal Behaviour Science*. 28(1-2): 15-39.
- 2 Bouissou M.F., Porter R.H., Boyle L. & Ferreira G. 1996.** Influence of a conspecific image of own vs. different breed on fear reactions of ewes. *Behavioural Processes*. 38(1): 37-44.
- 3 Cabos N.S. 2001.** *Biología general del reactivo biológico*. In: Zuniga J.M., Marí J.A.T., Milocco S.N. & Piñeiro R. (Eds). *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, pp.23-82.
- 4 Carbajal S. & Orihuela A. 2001.** Minimal Number of Conspecifics Needed to Minimize the Stress Response of Isolated Mature Ewes. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 4(4): 249-255.
- 5 Cockram M.S., Ranson M., Imlah P., Goddard P.J., Burrells C. & Harkiss G.D. 1994.** The behavioural, endocrine and immune responses of sheep to isolation. *Animal Production*. 58: 389-399.

- 6 Da Costa A.P., Leigh A.E., Man M.S. & Kendrick K.M. 2004.** Face pictures reduce behavioural, autonomic, endocrine and neural indices of stress and fear in sheep. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences*. 271: 2077-2084.
- 7 Doyle R.E., Fisher A.D., Hinch G.N., Boissy A. & Lee C. 2010.** Release from restraint generates a positive judgement bias in sheep. *Applied Animal Behaviour Science*. 122(1): 28-34.
- 8 Dwyer C.M. & Lawrence A.B. 2008.** *Introduction to Animal Welfare and the Sheep*. In: Dwyer C. (Ed). *The Welfare of Sheep*. Edinburgh: Springer Netherlands, pp.1-40.
- 9 Hargreaves A.L. & Hutson G.D. 1997.** Handling systems for sheep. *Livestock Production Science*. 49(2): 121-138.
- 10 Moberg G.P. 2000.** Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare. In: Moberg G.P. & Mench J.A. (Eds.). *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. : CABI Publishing, v.1, pp.1-21.
- 11 National Research Council 1996.** Guide for the care and use of laboratory animals. 7th edn. Washington D.C.: National Academy Press, p.162.
- 12 National Research Council 2006.** Guidelines for the humane transportation of research animals. D.C.: National Academies Press, p.141.
- 13 Niezgoda J., Wronska D., Pierzchala K., Bobek S. & Kahl S. 1987.** Lack of adaptation to repeated emotional stress evoked by isolation of sheep from the flock. *Zentralbl Veterinarmed A*. 34(10): 734-739.
- 14 Nowak R., Porter R.H., Blache D. & Dwyer C.M. 2008.** *Behaviour and the Welfare of the Sheep*. In: *The Welfare of Sheep*. Dwyer C. (Ed). Edinburgh: Springer Netherlands, pp. 81-134.
- 15 Obernier J.A. & Baldwin R.L. 2006.** Establishing an appropriate period of acclimatization following transportation of laboratory animals. *ILAR Journal*. 47(4): 364-369.
- 16 Parrott R.F., Houpt K.A. & Misson B.H. 1988.** Modification of the responses of sheep to isolation stress by the use of mirror panels. *Applied Animal Behaviour Science*. 19(3-4): 331-338.
- 17 Price E.O. & Thos J. 1980.** Behavioral responses to short-term social isolation in sheep and goats. *Applied Animal Ethology*. 6(4): 331-339.
- 18 Smith R.F. & Dobson H. 2002.** Hormonal interactions within the hypothalamus and pituitary with respect to stress and reproduction in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*. 23(1-2): 75-85.
- 19 Van-Adrichem P.W.M. & Vogt J.E. 1993.** The effect of isolation and separation on the metabolism of sheep. *Livestock Production Science*. 33(1-2): 151-159.